



REC'D 21 JUN 1999

WIPO PCT

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung**

*EP99/3156*

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung  
unter der Bezeichnung

"Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen,  
die an der Stärkesynthese beteiligt sind"

am 8. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen  
Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 12 N, C 07 H und A 01 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 29. April 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Patenten- und Markenzeichen: 198 20 607.0

Faust

**Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesyntese beteiligt sind**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Enzym aus Weizen codieren, das an der Stärkesyntese in Pflanzen beteiligt ist. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine lösliche Stärkesyntase vom Typ I.

10 Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, Wirtszellen, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die die erfundungsgemäß Nucleinsäuremolekülen enthalten.

15 Ferner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von erfundungsgemäß Nucleinsäuremolekülen eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

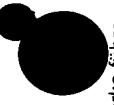
20 Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

25 Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Hierbei ist Weizen eine der wichtigsten Kulturpflanzen, da ca. 20 % der Gesamtstärkeproduktion der Europäischen Gemeinschaft aus ihr gewonnen werden.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten und deren Kettenlängen unterscheiden, die darüber hinaus derivatisiert, z.B. phosphoryliert sein können. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In Weizen besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 11 bis 37 % aus Amylose-Stärke.

Um eine möglichst vielfältige Anwendung von geeigneten Stärken für unterschiedlichste industrielle Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärken zu synthetisieren, die für verschiedene Verwendungszwecke besonders gut geeignet sind. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht in züchterischen Maßnahmen. Die züchterischen Einflussnahme erweist sich beim Weizen aufgrund seines polyploidien Charakters (tetra- und hexaploid) jedoch sehr schwer. Erst kürzlich gelang durch Kreuzung natürlich auftretender Mutanten die Herstellung eines "waxy" (Amylose-freien) Weizens (Nakamura et al., Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 253-259).

25 Eine Alternative zu züchterischen Verfahren besteht in der gezielten Modifikation stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthese und/oder Stärkemodifikation beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der diese Enzyme codierenden Nucleinsäuremoleküle.



3

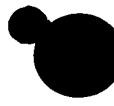
Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthase in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärkespeichernden Geweben die Amyloplasten.

Wichtige an der Stärkesynthase beteiligte Enzyme sind die Stärkesynthasen sowie die Verzweigungsenzyme. Bei den Stärkesynthasen sind verschiedene Isoformen beschrieben, die alle eine Polymerisierungsreaktion durch Übertragung eines Glucosylrestes von ADP-Glucose auf  $\alpha$ -1,4-Glucane katalysieren.

Verzweigungsenzyme katalysieren die Einführung von  $\alpha$ -2,6-Verzweigungen in lineare  $\alpha$ -1,4-Glucane.

Stärkesynthasen können in zwei Klassen eingeteilt werden: die Stärkekorn gebundenen Stärkesynthasen ("granule-bound starch synthases"; GBSS) und die löslichen Stärkesynthasen ("soluble starch synthases"; SSS). Diese Unterscheidung ist nicht in jedem Fall eindeutig zu treffen, da einige der Stärkesynthasen sowohl stärkekorngebunden als auch in löslicher Form vorliegen (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191-198; Mu et al., Plant J. 6 (1994), 151-159). Für verschiedene Pflanzenspezies werden innerhalb dieser Klassen wiederum verschiedene Isoformen beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Startermolekülen unterscheiden (sogenannte "primer dependent" (Typ II) und "primer independent" (Typ I) starch synthases).

Lediglich für die Isoform GBSS I gelang es bisher, die genaue Funktion bei der Stärkesynthase zu ermitteln, in denen diese Enzymaktivität stark oder vollkommen reduziert ist, synthetisieren eine amylosefreie (sogenannte "waxy") Stärke (Shure et al., Cell 35 (1983), 225-233; Visser et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289-296; WO 92/11376), so daß diesem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Synthese der Amylose-Stärke zugesprochen wird. Dieses Phänomen wird ebenfalls in Zellen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beobachtet (Deinre et al., J. Bacteriol. 174 (1992), 3612-3620). Bei *Chlamydomonas* konnte darüber hinaus gezeigt werden,



4

daß GBSS I nicht nur an der Synthese der Amylose beteiligt ist, sondern auch einen Einfluß auf die Amylopektinsynthase besitzt. In Mutanten, die keine GBSS I-Aktivität aufweisen, fehlt eine bestimmte Fraktion des normalerweise synthetisierten Amylopektins, die längerkettige Glucane aufweist.

5 Die Funktionen der anderen Isoformen der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, insbesondere der GBSS II, und der löslichen Stärkesynthasen sind bisher unklar. Es wird angenommen, daß die löslichen Stärkesynthasen zusammen mit Verzweigungsenzymen an der Synthese des Amylopektins beteiligt sind (siehe z.B. Ponstein et al., Plant Physiol. 29 (1990), 234-241) und daß sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der Stärkesynthaserate spielen.

Bei Weizen wurden mindestens zwei Isoformen der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase (60 kDa und 100 – 105 kDa) und eine weitere Isoform, die möglicherweise eine lösliche Stärkesynthase (Denyer et al., Planta 196 (1995), 256-265; Rahman et al., Aust. J. Plant Physiol. 22 (1995), 793 – 803) repräsentiert, auf der Proteinebene identifiziert. Das Vorhandensein mehrerer SSS-Isoformen wurde schon früher mit Hilfe chromatographischer Methoden nachgewiesen (Rijven, Plant Physiol. 81 (1986), 448 – 453). Eine GBSS I aus Weizen codierende cDNA ist bereits beschrieben (Ainsworth et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 67 bis 82).

10 Nucleinsäuresequenzen, die Stärkesynthase-Isoformen aus Weizen codieren bzw. Teilesequenzen solcher Nucleinsäuren sind bisher aus der WO 97/45545 bekannt.

15 CDNA-Sequenzen, die für andere Stärkesynthasen als für die GBSS I codieren, wurden bisher lediglich für Erbse (Dry et al., Plant J. 2 (1992), 193 – 202), Reis (Baba et al., Plant Physiol. 103 (1993), 565 bis 573) und Kartoffel (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283 bis 294) beschrieben.

20 Außer beim Weizen wurden lösliche Stärkesynthasen auch in einer Reihe weiterer

Pflanzenarten identifiziert. Lösliche Stärkesynthasen sind beispielsweise bis zur Homogenität aus Erbsen (Denyer und Smith, *Planta* 186 (1992), 609 bis 617) und Kartoffel (Edwards et al., *Plant J.* 8 (1995), 283 bis 294) isoliert worden.

5 In diesen Fällen stellte sich heraus, daß die als SSS III identifizierte Isoform der löslichen Stärkesynthase identisch ist mit der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase GBSS II (Denyer et al., *Plant J.* 4 (1993), 191 bis 198; Edwards et al., *Plant J.* 8 (1995), 283 bis 294). Für einige weitere Pflanzenspezies wurde das Vorhandensein mehrerer SSS-Isoformen mit Hilfe chromatographischer Methoden beschrieben, beispielsweise bei Gerste (Tyneill und Schulman, *Physiologia Plantarum* 89 (1993) 835-841; Kreis, *Planta* 148 (1980), 412 bis 416). DNA-Sequenzen, die diese Proteine codieren, wurden jedoch bisher nicht beschrieben.

Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärke-speichernde Pflanzen, 5 vorzugsweise Getreide, insbesondere Weizen, dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen der Stärkesynthasen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,

) Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren Hilfe es möglich ist, gentechnisch modifizierte Pflanzen herzustellen, die die Herstellung von in ihren chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften veränderten pflanzlichen Stärken ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase aus Weizen, wobei derartige Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die im wesentlichen die unter Seq ID No. 2

angegebene Aminosäuresequenz umfassen. Insbesondere betrifft die Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon enthalten, bevorzugt Moleküle, die die in Seq ID No. 1 angegebene codierende Region sowie entsprechende (korrespondierende) Ribonucleotidsequenzen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die mit einem der erfindungsgemäßigen Nucleinsäuremoleküle hybridisieren.

10 Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die eine lösliche Stärkesynthase aus Weizen codieren und deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

15 Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz aufweisen, die zu der gesamten oder einem Teil einer der obengenannten Sequenzen komplementär ist.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise 20 unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

25 Besonders bevorzugt erfolgt eine "Hybridisierung", unter den folgenden Bedingungen:  
Hybridisierungspuffer: 2 x SSC; 10 x Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml Herringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder

0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2;  
1 mM EDTA

7% SDS

Hybridisierungstemperatur T = 65 bis 68°C

Waschpuffer: 0,2 x SSC; 0,1% SDS  
Waschtemperatur T = 40 bis 68°C.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell Stärkesynthetasen aus jeder beliebigen Weizenpflanze codieren, die derartige Proteine exprimiert.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Weizen oder Weizenpflanzengewebe isoliert werden. Alternativ können sie durch gentechnische Methoden oder durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Ny).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die eine erfindungsgemäße Stärkesynthase aus Weizen codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Ny).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen

Nucleinsäuremoleküle codieren Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Ladungseigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Wichtige Charakteristika einer Stärk synthase sind: i) ihre Lokalisation im Stroma der Plastiden pflanzlicher Zellen; ii) ihre Fähigkeit zur Synthese linearer  $\alpha$ -1,4-verknüpfter Polyglucane. Die enzymatische Aktivität der Stärk synthase kann wie in Denyer und Smith (Planta 186 (1992), 606 bis 617) beschrieben bestimmt werden. Bei dem durch die erfundungsgemäßes Nucleinsäuremoleküle codierten Protein handelt es sich um eine lösliche Stärk synthase vom Typ I aus Weizen. Diese Proteine weisen gewisse Homologiebereiche zu bisher bekannten löslichen Stärk synthasen aus anderen Pflanzenarten auf.

Bei den erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekülen kann es sich um DNA-Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genomische Moleküle. Ferner können die erfundungsgemäßes Nucleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein. Die erfundungsgemäßes Nucleinsäuremoleküle können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein, oder durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt sein.

Gegenstand der Erfundung sind auch Oligonucleotide, die spezifisch mit einem erfundungsgemäßes Nucleinsäuremoleküly hybridisieren. Derartige Oligonucleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens 15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nucleotiden. Die erfundungsgemäßes Oligonucleotide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere

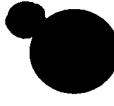
Proteine, insbesondere andere Stärk synthasen codieren. Die erfundungsgemäßes Oligonucleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden oder als Hybridsisprobe für die Isolierung verwandter Gene. Ebenso können sie Bestandteile von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Molekülen, die für geeignete Ribozyme codieren.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfundungsgemäßes Nucleinsäuremoleküle enthalten. Derartige Vektoren sind zur Transformation pro- oder eukaryontischer, vorzugsweise pflanzlicher Zellen geeignet.

Vorzugsweise besonders bevorzugt erlauben sie die Integration der erfundungsgemäßes Nucleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können.

Der Begriff "Vektor" bezeichnet im allgemeinen ein geeignetes, dem Fachmann bekanntes Hilfsmittel, das den gezielten Transfer eines ein- oder doppelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle ermöglicht, beispielsweise einen DNA- oder RNA-Virus, ein Virusfragment, ein Plasmidkonstrukt, das in An- oder Abwesenheit von regulatorischen Elementen zum Nukleinsäure-Transfer in Zellen geeignet sein kann, Trägermaterialien wie Glasfaser oder auch Metallpartikel wie sie z.B. beim "particle gun"-Verfahren eingesetzt werden können, er kann aber auch ein Nukleinsäuremolekü umfassen, das durch chemische oder physikalische Verfahren direkt in eine Zelle gebracht werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die



11

Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in *Escherichia coli*, ist insofern interessant, als daß auf diese Weise eine genauere Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, für die diese Moleküle codieren, ermöglicht wird. Es ist insbesondere möglich, das Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies läßt Rückschlüsse zu auf die Funktion, die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

Darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutationen möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'-Ende der codierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielsweise möglich, Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transitpeptide). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulation des Enzyms hat. Auf diese Weise

12

können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten  $K_m$ -Wert besitzen oder nicht mehr den normalenweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

5 Des Weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen, indem sie beispielsweise ADP-Glucose-6-Phosphat anstelle von ADP-Glucose verwerfen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts- Temperatur-Profil aufweisen.

10 Für die gentechnische Modifikation prokaryontischer Zellen können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptorien oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethode werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse oder weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere pro- oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen abstammen.

20 25 30

und ein erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um pro- oder eukaryontische, insbesondere um pflanzliche Zellen.

5 Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinant herstellbare Proteine mit der Aktivität einer Stärkesynthase, die durch die erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, worin eine erfundungsgemäß Wirtszelle unter dem Fachmann bekannten, geeigneten Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des erfundungsgemäßes Proteins 10 erlauben, und es anschließend aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

Durch die Bereitstellung der erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen gezielt einzutreten und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, beispielsweise dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, den Gel- oder Filmbildungseigenschaften, der Stärkegröße und/oder der Stärkekernform im Vergleich zu bekannter Stärke 20 verändert ist.

Möglich ist somit die Expression der erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden Stärkesynthase zu erhöhen, oder die Einführung in Zellen, die dieses Enzym natürlicherweise nicht exprimieren. Ferner ist es möglich, die erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfundungsgemäß Stärkesynthasen zu erhalten, die nicht mehr den natürlichen zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen, bzw. veränderte Temperatur-Aktivitätsprofile 25 oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen.

Bei der Expression der erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die die Lokalisation in Plastiden gewährleistende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; 10 Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder Vektor transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derart transformierten Zellen abstammen. 5 Derartige Zellen enthalten ein oder mehrere erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, wobei diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem geeigneten Promotor. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlichenerweise in diesen 10 Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfundungsgemäß transgene Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekuls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Molekuls. Handelt es sich bei dem (dem) in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den 15 20 25 30 Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfundungsgemäß

Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere dadurch unterschieden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist(sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt(vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach überprüfen.

Ist das in das pflanzliche Genom eingeführte erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die transgenen Pflanzenzellen Transkripte der erfindungsgemäß 10 Nucleinsäuremoleküle auf, die sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach nachweisen lassen.

Ist das eingeführte erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäß Zellen von natürlicherweise 15 auftretenden beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression erfindungsgemäß Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten vorzugsweise mehr Transkripte der erfindungsgemäß Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. "Mehr" bedeutet dabei vorzugsweise mindestens 10% mehr, bevorzugt 20 mindestens 20% mehr und besonders bevorzugt mindestens 50% mehr Transkripte als entsprechende, nicht-transformierte Zellen. Vorzugsweise weisen die Zellen ferner eine entsprechende (mindestens 10%, 20% bzw. 50%ige) Aktivitätssteigerung 25 des erfindungsgemäß Proteins auf. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

Die durch Regeneration der erfindungsgemäß transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um 30 Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, vorzugsweise

stärkesynthetisierende bzw. stärkespeichernde Pflanzen, besonders bevorzugt Roggen, Gerste Hafer, Weizen, Hirse, Sago, Mais, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse oder Arrowroot, insbesondere Weizen, Mais, Reis und Kartoffel.

5

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäß Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, Calli, Protoplasten, Zellkulturen etc. . .

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäß Pflanze und/oder aus stärkespeichernden Teilen einer solchen Pflanze.

15

Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärkespeichernden Teilen von Pflanzen, insbesondere aus Weizen, sind dem Fachmann bekannt, vgl. z.B. Ecthoff et al. (Cereal Chem. 73 (1996) 54-57) "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BelMILLer und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468; Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-478; Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528; Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtröckner und Wirbelschichttrockner.

20

Die erfindungsgemäß transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren 30

aufgrund der Expression eines erfindungsgemäßigen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, z.B. dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärke- 5 korngroße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Film- oder Gelbildungseigenschaften von Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu bekannten Stärken verändert sein.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Stärke, die aus den erfindungsgemäßigen Pflanzenzellen, Pflanzen sowie deren Vermehrungsmaterial erhältlich ist und Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäßige 15 Verfahren erhältlich ist.

15 Ferner ist es möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßigen Nucleinsäuremoleküle Pflanzenzellen und Pflanzen zu erzeugen, bei denen die Aktivität eines erfindungsgemäßigen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthese einer Stärke mit veränderten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein transgene Pflanzenzelle, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, in der die Aktivität einer Stärkesynthase im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen reduziert ist.

25 Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität einer Stärkesynthase kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyme, das spezifisch Transkripte spaltet, die eine Stärkesynthase codieren, unter Verwendung 30 der erfindungsgemäßigen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Verfahren, vgl. Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al.,

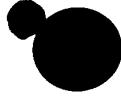
(Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Bono et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

5 Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität einer erfindungsgemäßigen Stärkesynthase in den pflanzlichen Zellen die Anzahl der sie codierenden Transkripte reduziert, z.B. durch Expression einer antisense-RNA.

10 Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfasst, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im 15 allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die 20 kürzer als 2500 bp sind.

25 Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßigen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

30 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßigen Zelle oder Pflanze und/oder aus stärkespeichernden Teilen einer solchen Pflanze.



Gegenstand der Erfindung ist ferner Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Zellen, Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial oder deren Teilen erhältlich ist sowie Stärke, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhältlich ist.

5

Die erfindungsgemäßes Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

10

Grundsätzlich lassen sich die Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemäßes Stärken in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfasst die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch z.B. geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

25 Der andere Bereich, in dem die erfindungsgemäßes Stärken wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

#### 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wässrigen Zusatzstoffen



übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparentz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Viskositätsstabilität in Salzlösungen, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

5

10 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie  
In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

15

20 2.1 Papier- und Pappeindustrie  
Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden. Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und

25 30

eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

5 2.2 Klebstoffindustrie Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungselein für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Kleitverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilauffrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

30 2.4 Baustoffindustrie Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei

Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gips bei vermischt Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbelägen werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

5 2.5 Bodenstabilisation Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

10 2.6 Einsatz in Pflanzenschutz- und Düngemitteln Ein Einsatzbereich liegt in der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder überreichender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

15 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln einge-

setzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit sowohl quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

5 Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

10 Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. briekettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

15

2.9 Erz- und Kohleschlammabtibereitung

20 Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammabtibereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

2.10 Gießereihilfsstoff

25 Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittelversetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

30 Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindfestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes

2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

5 In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

10

2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

15 Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

20

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

25 Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozeß (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

30 Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken

diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyethylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wässrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufsärfdichte, kein Abtragen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepropolymersäure gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgeprägten Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepropolymersäure zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke

bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpflanzungen.

5 Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Viskositätsstabilität in Salzlösungen, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier-/Austabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

10 Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Verfahren kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch Hitzebehandlung, Behandlung mit organischen oder anorganischen Säuren, Oxidation und Veresterungen, welche z.B. zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratsäuren führen. Des Weiteren können ein- oder mehrwertige Alkohole in Gegenwart starker Säuren zur Erzeugung von Stärkeether eingesetzt werden, so daß Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxyalkylether, O-Carboxymethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether), S-haltige

15

Eine bevorzugte Verwendung der erfindungsgemäße Stärken liegt in der Herstellung von Verpackungsmaterial und Einwegartikeln.

5 Zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Sinnvolle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatinen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression des HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

25 Ferner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die ein Protein mit der Funktion einer lösliche Stärkesynthase aus Weizen codieren. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle erlauben die Herstellung dieses Enzyms, dessen funktionale Identifizierung innerhalb der Stärkesynthase, die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist und ermöglicht somit die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in derartig modifizierten Pflanzen.

5 10 15 20 25 30

Die erfindungsgemäß Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, bei denen die Aktivität der erfindungsgemäßen Stärkesynthase erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkesynthase beteiligter Enzyme verändert sind. Durch die Veränderung der Aktivitäten einer Stärkesynthase in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Ferner können Nucleinsäuremoleküle, die eine Stärkesynthase codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener GBSS I-, SSS- oder GBSS II-Proteine aufgrund eines antisense-Effektes oder einer Mutation inhibiert ist oder die Synthese des Verzweigungsenzym 15 inhibiert ist (wie z.B. in WO 92/14827 oder Shannan und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86).

20 25 30

Soll die Inhibition der Synthese mehrerer an der Stärkesynthase beteiligter Enzyme in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden bzw. unter der Kontrolle

eines gemeinsamen Promoters stehen. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise von 5 kb nicht überschreiten.

10 Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme, "Debranching"-Enzyme, Stärkephosphorylases und Disproportionierungsenzyme. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

20 Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die Konstrukte in pflanzliche Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind (Shannon und Ganwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylases. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

5 Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingegeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelektrophoresen und weitere biochemisch-molekulärbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

10

15

20

25

30

5 Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingegeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelektrophoresen und weitere biochemisch-molekulärbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

5 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

5 Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus

derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist in der Regel die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid-T-DNA als Flankengebiet mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einem binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses erhält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium läßt sich zur Transformation von Pflanzenzellen verwenden.

5

10

15

20

25

werden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensionskultiverte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdruckerei Kanters B.V., Alkmaardam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben

Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne et al., *Euphytica* 85 (1995), 35 – 44).

Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Mareshwari et al., *Critical Reviews in Plant Science* 14 (2) (1995), 149 bis 178; Hess et al. (*Plant Sci.* 72 (1990), 233) benutzen das Verfahren der Makroinjektion, um Pollen und Agrobakterien in unmittelbare Nähe zu bringen. Die Mobilisierung des Plasmids, daß das nptII Gen als selektierbaren Marker enthielt, wurde mittels Southern Blot Analyse und NPTII Test nachgewiesen. Die Transformanten zeigten einen normalen Phänotyp und waren fertil. Die Kanamycin-Resistenz konnte in zwei aufeinanderfolgende Generationen nachgewiesen werden. Die erste transgene, fertile Weizenpflanze, die nach Beschuß mit Mikroprojektil-gebundener DNA regeneriert werden konnte, wurde von Vasil et al. (*Bio/Technology* 10 (1992), 667 – 674) beschrieben. Das Zielgewebe für den Beschuß war eine embryogene Kalluskultur (Typ C Kallus). Als Selektionsmarker wurde das bar Gen eingesetzt, das eine Phosphinothricin Acetyltransferase codiert und somit eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin vermittelt. Ein weiteres System wurde von Weeks et al. (*Plant Physiol.* 102 (1993), 1077 – 1084), sowie Becker et al. (*Plant J.* 5(2) (1994), 299 – 307) beschrieben. Hier ist das Zielgewebe für die DNA-Transformation das Skutellum unreifer Embryonen, das in einer einleitenden *in vitro* Phase zur Induktion somatischer Embryonen angeregt wurde. Die Effizienz der Transformation liegt bei dem von Becker et al. (*loc. cit.*) entwickelten System mit 1 transgene Pflanze pro 83 Embryonen der Sorte "Florida" deutlich höher als bei dem von Weeks et al. etablierten System mit 1 bis 2 transgenen Pflanzen pro 1000 Embryonen der Sorte "Bohwhite".

## Beispiele beschriebenen Transformations-experimente.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biotid wie Phosphinothricin oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin oder Hygromycin vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen gestatten, denen die eingeführte DNA fehlt.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., *Plant Cell Reports* 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden. Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp ~~oder~~ andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung illustrieren und stellen keinenlei Beschränkung dar.

25

## 1. Cloniervungsverfahren

Zur Cloniierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

5

#39: MS + 2,4-D (2 mg/ml) + je 0,5 N Mannit/Sorbit

36

## 1. Cloniervungsverfahren

Zur Cloniierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

5

#39: MS + 2,4-D (2 mg/ml) + je 0,5 N Mannit/Sorbit

Die angegebenen Medien wurden auf den pH-Wert 5,6 mit KOH eingestellt und mit 0,3 % Gelrite verfestigt.

## 2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die antisense-Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) verwendet. Für die *in vivo* Excision wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet.

10

Die Methode zur Transformation unreifer Embryonen aus Weizen wurde von Becker und Lörz (D. Becker und H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B12: 1 bis 20) entwickelt und optimiert.

5

## 3. Transformation unreifer Weizenembryonen

## Medien

MS: 100 ml/l Makrosalz (D. Becker und H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B 12:1-20)  
1 ml/l Mikrosalz  
2 ml/l Fe/NaEDTA  
30 g/l Saccharose

20

Zur Transformation werden unreife Weizenembryonen auf Medium # 39 zur osmotischen Vorkultur (2 bis 4 h, 26°C, dunkel) umgesetzt.

Nach 2 bis 4 tägiger Vorkultur (26°C, dunkel) werden die Explantate auf Medium # 39 zur osmotischen Vorkultur (2 bis 4 h, 26°C, dunkel) umgesetzt.

20

Zur biolistischen Transformation werden pro Schuß ca. 29 µg Goldpartikel, auf die zuvor wenige µg der Ziel-DNA gefällt wurde, eingesetzt. Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um Co-Transformanten handelt, wird die Ziel-DNA in einem Verhältnis von 1:1, bestehend aus dem Zielgen und einem Resistenzmarken (bar-Gen) dem Fällungsansatz zugegeben.

#31: MS + 2,4-D (2 mg/l) + Phosphinothricin (PPT, aktive Komponente des Herbizids BASTA (2 mg/l))

4. DIG-Markierung von DNA-Fragmenten

#32: MS + 2,4-D (0,1 mg/l) + PPT (2 mg/l)

Die Markierung von DNA-Fragmenten, die als Screeningsonden eingesetzt wurden, erfolgte über eine spezifische PCR unter Einbau von DIG-markiertem dUTP.

30

Die Methode zur Transformation unreifer Embryonen aus Weizen wurde von Becker und Lörz (D. Becker und H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B12: 1 bis 20) entwickelt und optimiert.

30

(Boehringer Mannheim, Deutschland).

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:

5 20 x SSC 175,3 g NaCl  
88,2 g Natrium-Citrat  
ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O  
pH 7,0 mit 10 N NaOH

10 Beispiel 1

Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine lösliche Stärkesynthase (SS I) aus Weizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida) codiert

15 Zur Identifizierung der vollständigen cDNA, die eine Isoform einer löslichen Stärkesynthase (SS I) aus Weizen codiert, wurde die Strategie des homologen Screening verfolgt. Hierfür wurde eine cDNA-Bank aus Weizen mit geeigneten Oligonukleotiden durchmustert (gescreent). Das SS I spezifische Oligonukleotid, das zum Screening eingesetzt wurde, war mittels des 5'RACE-Verfahrens (Rapid Amplification of cDNA Ends) basierend auf den Sequenzinformationen partiellen SS I cDNA Klons, wie in WO/97/45545 beschrieben, wie nachfolgend beschrieben isoliert worden.

Die Synthese der Weizen cDNA Bank erfolgte aus poly(A)+RNA von ca. 20 Tage alten Karyopsen (Endosperm) in einem Lambda Zap II Vektor analog den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland). Nach Titerbestimmung der cDNA-Bank konnte ein Primärtitre von 1,26x10<sup>6</sup> pfu/ml ermittelt werden.

25 Das Durchmustern der cDNA Bank wurde mit einer SS I Sonde aus Weizen durchgeführt. Es wurde mittels 5'-RACE ein DNA Fragment isoliert und die

Amplifizierung des 5'Endes mit einem 5'RACE-Kit (nachfolgend "Kit") der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Alle Schritte wurden analog den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden ausschließlich Reagenzien und Enzyme aus dem Kit verwendet, wenn nicht anders beschrieben.

5 20 x SSC 175,3 g NaCl  
88,2 g Natrium-Citrat  
ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O  
pH 7,0 mit 10 N NaOH

10 Beispiel 1

Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine lösliche Stärkesynthase (SS I) aus Weizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida) codiert

15 Zur Identifizierung der vollständigen cDNA, die eine Isoform einer löslichen Stärkesynthase (SS I) aus Weizen codiert, wurde die Strategie des homologen Screening verfolgt. Hierfür wurde eine cDNA-Bank aus Weizen mit geeigneten Oligonukleotiden durchmustert (gescreent). Das SS I spezifische Oligonukleotid, das zum Screening eingesetzt wurde, war mittels des 5'RACE-Verfahrens (Rapid Amplification of cDNA Ends) basierend auf den Sequenzinformationen partiellen SS I cDNA Klons, wie in WO/97/45545 beschrieben, wie nachfolgend beschrieben isoliert worden.

20 B2F5: 5CCTCCCAATTCAAGGATTAGTG 3' (Seq ID No. 3)  
B2F6: 5CCTCGCATGCAGCATAGCAA 3' (Seq. ID No. 4)

25 B2F6: 5CCTCGCATGCAGCATAGCAA 3' (Seq. ID No. 4)

20 Die nach vorstehenden Verfahren erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Fragmente mit einer Größe über 800bp isoliert. Die Klonierung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem pCR-Script SK(+) Cloning Kit der Firma Stratagene (Heidelberg). Durch Sequenzanalyse der

30 Das Durchmustern der cDNA Bank wurde mit einer SS I Sonde aus Weizen durchgeführt. Es wurde mittels 5'-RACE ein DNA Fragment isoliert und die



Die Klonierung des Expressionsvektors erfolgte durch Restriktion eines Fragmentes aus dem Klon TaSSI 8/1 mit den Restriktionsenzymen Xba I und Ssp. I. Das Fragment wurde an den Enden mittels einer Klenow Reaktion aufgefüllt und anschließend in die Sma I Klonierungsstelle des Expressionsvektors pUbI:cas ligiert. Der entstandene Expressionsvektor wurde pTA-gamma-SS1 8/1 bezeichnet. In einem zweiten Konstrukt wurde der 5'-untranslatierte Leader des Klons TaSSI 8/1 zunächst durch eine Behandlung mit Exonuklease entfernt. Sodann erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor pUbI:cas. Dieses Konstrukt wurde pTa-gamma-SS1 8/1-2 bezeichnet.

Der Vektoren pTa-gamma-SS1-8/1 und pTa-gamma-SS1-8/1-2 wurden anschließend zur Transformation von Weizen verwendet

SEQUENZPROTOKOLL

Die Klonierung des Expressionsvektors erfolgte durch Restriktion eines Fragmentes aus dem Klon TaSSI 8/1 mit den Restriktionsenzymen Xba I und Ssp. I. Das Fragment wurde an den Enden mittels einer Klenow Reaktion aufgefüllt und anschließend in die Sma I Klonierungsstelle des Expressionsvektors pUBI:cas ligiert. Der entstandene Expressionsvektor wurde pTA-gamma-SSI 8/1 bezeichnet. In einem zweiten Klon wurde der 5'-untranslatierte Leader des Klons TaSSI-8/1 zunächst durch eine Behandlung mit Exonuklease entfernt. Sodann erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor pUBI:cas. Dieses Konstrukt wurde pTA-gamma-SSI-8/1-2 bezeichnet.

5 (1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Hoechst Schering Agrevo GmbH  
(B) STRASSE: Mirastraße 54  
(C) ORT: Berlin  
(D) BUNDESLAND: -  
(E) LAND: Germany  
(F) POSTLEITZAHL: 13509  
(G) TELEFON: 069-105-82808

10

(ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LAGE: 314..2581

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

10	TGCTAACAGA TATTAGGAA AATATGGCA CGAGGCGCAC TCCACTCCC TTGCCCACT	60	CCCACCTTC TCTCCCGGG CACACCGGT CGGACCGGC TCATCACCA TCACCTGGC	120	CTCGGCCACC GGCAAAACCCC CGGATCCGCT TTGGCAGGCA GCGFACTAAA ACCCGGGGA	180	CGGCCCCGG CGGAGCGAGC AGGACCGAG AGGGCTTCCC CGGGCCCGA	240	CGGAGGGG CGATCCACCG TCGGTGGCTC CGCACCTCTC CGGCTCTTC CCCCTGTCGG	300	CGGCCCAAA CCC ATG CGG GCG AGC GTC GGC GCC GGG TGC CTC GCC	349	Met Ala Ala Thr Val Gly Ala Gly Cys Leu Ala	1	5	10	CCC AGC GTC CGC CGC GGC GAT CCG GCG ACG GCG GCC CGG GCG TCC	397	Pro Ser Val Arg Leu Arg Ala Asp Pro Ala Thr Ala Ala Arg Ala Ser	15	20	25	GCC TGC GTC CGC GCG CCG CTC CGG CGC TTG GCG CGG CGC CGC TAC	445	Ala Cys Val Val Arg Ala Arg Leu Arg Arg Leu Ala Arg Gly Tyr	30	35	40	GTC GCC GAG CTC AGC AGG GAG GCC CCC GCG GCG CCC GCG CAG CAG	493	Val Ala Glu Leu Ser Arg Glu Gly Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gln Glu	45	50	55	CAG CAA CTG GCC CCG CTC GTG CCA GGC TTC CTC GCG CCG CCG	541	Gln Gln Ieu Ala Pro Pro Leu Val Pro Pro Ala Pro Pro Pro	60	65	70	75	CCC GCG CCC CAG TCG CCG GCC CCG CCG CAG CAG CCC CTC GCG CAG	589	Pro Ala Pro Ala Gln Ser Pro Ala Pro Asp Leu Leu Pro Asp	80	85	90	GCC GCG CTG CGG GAA CTC CGG CCC GAC CTC GTC GAA GGG ATT GCF	637	Ala Gly Val Gly Glu Leu Ala Pro Asp Leu Leu Gln Gln Asp Ser	95	100	105	GAG GAT TCC ATC GAC AGC ATA ATT GTG CCT GCA AGT GAG CAG GAT TCT	685	Glu Asp Ser Ile Asp Ser Ile Ile Val Ala Ala Ser Gln Asp Ser	110	115	120	GAG ATC ATG GAT CGG AAT GAG CAA CCT CAA GCT AAA GTT ACA CGT AGC	733	Glu Ile Met Asp Ala Asn Glu Gln Pro Gln Ala Lys Val Thr Arg Ser	125	130	135	ATC GTG TTT GTG ACT GGT GAA GCT CCT TAT GCA AAG TCA GGG GGG	781	Ile Val Phe Val Thr Gly Glu Ala Ala Pro Tyr Ala Lys Ser Gly Gly	145	150	155	5	TTG GGA GAT GTT TGT GGT TCA CCA ATT GCT CTT GCT CGT GGT	829	Leu Gly Asp Val Cys Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Ala Arg Gly	160	165	170	CAC CGA GTG ATG GTT GTC ATG CCA AGA TAC TTA ATT GGG TCC TCT GAT	877	His Arg Val Met Val Met Pro Arg Tyr Leu Asn Gly Ser Ser Asp	175	180	185	AAA AAC TAT GCA AAG GCA TTA TAC GCG AAG CAC ATT AAG ATT CCA	925	Lys Asn Tyr Ala Lys Ala Leu Tyr Thr Ala Lys His Ile Lys Ile Pro	190	195	200	TGC TTT GGG GGA TCA CAT GAA GTG ACC TTT TTT CAT GAG TAT AGA GAC	973	Cys Phe Gly Gly Ser His Glu Val Thr Phe His Glu Tyr Arg Asp	205	210	215	AAC GTC GAT TGG GTG TTT GTC GAT CCG TCA TAT CAC AGA CCA GGA	1021	Asn Val Asp Tyr Val Phe Val Asp His Pro Ser Tyr His Arg Pro Gly	220	225	230	TAC ACA CTC CTT TGC TAT GCT GCA TGC GAG GCC CCA CTA ATC CTT GAA	1069	Ser Leu Tyr Gly Asp Asn Phe Gly Ala Phe Gly Asp Alan Gln Phe Arg	240	245	250	TAC TCA TAT GGA GAT ATT TTT GGT GCT ATT GGT GAT ATT CAG TTC AGA	1117	Tyr Thr Leu Cys Tyr Ala Ala Cys Glu Ala Pro Leu Ile Leu Glu	255	260	265	TTG GGA GGA TAT ATT TAT GGA CAG AAT TGC ATG TTT GTC AAC GAT	1165	Leu Gly Tyr Ile Tyr Gly Glu Asn Cys Met Phe Val Val Asn Asp	270	275	280	TGG CAT GCC AGC CTT GTG CCA GTC CTT GCT GCA AAA TAT AGA CCA	1243	Trp His Ala Ser Leu Val Pro Val Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro	285	290	295	TAC GGT GTT TAC AGA GAT TCC CGC AGC ACC CTT GRT ATA CAT AAT TTA	1261	Tyr Gly Val Tyr Asp Ser Arg Ser Thr Leu Val Ile His Asn Leu	305	310	315	GCA CAA CAG GGT GTG GAG CCT GCA AGT ACA TAT CCT GAT CTG GGA TRG	1309	Ala His Gln Gly Val Glu Pro Ala Ser Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu	320	325	330	CCT CCT GAA TGG TAT GGA GCT TTA GAA TGG GTC TTT CCA GAA TGG GCA	1357	Pro Pro Glu Trp Tyr Gly Ala Leu Glu Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala	340	345	350
----	---	----	---	-----	---	-----	---	-----	--	-----	---	-----	---	---	---	----	---	-----	---	----	----	----	---	-----	---	----	----	----	---	-----	---	----	----	----	---	-----	---	----	----	----	----	---	-----	---	----	----	----	---	-----	---	----	-----	-----	---	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	---	-----	-----	-----	---	---	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	---	-----	-----	-----	---	------	---	-----	-----	-----	---	------	--	-----	-----	-----	---	------	---	-----	-----	-----	---	------	---	-----	-----	-----	---	------	---	-----	-----	-----	---	------	---	-----	-----	-----	---	------	---	-----	-----	-----	---	------	---	-----	-----	-----

AGG AGG CAT GCC CTT GAC AAG GGT GAG CCA GTT AAC TTT TTG AAA GGA  
 Arg Arg His Ala Leu Asp Lys Glu Ala Val Asn Phe. Leu Lys Glu  
 1405 350 355 360  
 5 GCA GTT GTG ACA GCA GAT CGC ATT GTG ACC GTC AGT CAG GGT TAT TCA  
 Ala Val Thr Ala Asp Arg Ile Val Thr Val Ser Gln Gly Tyr Ser  
 1453 365 370 375 380  
 10 TGG GAG GTC ACA ACT GCT GAA GGT GGA CAG GGC CTC AAT GAG CTC TTA  
 Trp Glu Val Thr Ala Glu Gly Gly Leu Asn Glu Leu Leu  
 1501 385 390 395 400  
 AGC TCC CGA AAA AGT GTA TTG AAT GGA ATT GGA ATT GAC ATT  
 Ser Ser Arg Lys Ser Val Leu Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile  
 1549 405 410  
 15 AAT GAT TGG AAC CCC ACC ACA GAC AAG TGT CTC CCT CAT TAT TCT  
 Asn Asp Trp Asn Pro Thr Thr Asp Lys Leu Pro His His Tyr Ser  
 415 420 425  
 20 GTC GAT GAC CTC TCT GGA AAG GTC GAA TTG CAG AAG  
 Val Asp Asp Leu Ser Gly Lys Ala Lys Cys Lys Ala Glu Leu Glu Lys  
 430 435 440 445  
 25 GAG TTG GGT TTA CCT GTC AGG GAG GAT GTT CCT CTG ATT GGC TTT ATT  
 Glu Leu Gly Leu Pro Val Arg Glu Asp Val Pro Leu Ile Glu Phe Ile  
 445 450 455 460  
 30 GGA AGA CTG GAT TAC CAG AAA GGC ATT GAT CTC ATT AAA ATG GCC ATT  
 Gly Arg Leu Asp Tyr Gln Lys Glu Ile Asp Leu Ile Lys Met Ala Ile  
 465 470 475  
 CCA GAG CTC ATG AGG GAG GAC GTG CAA TTT GTC ATG CTT GGA TCT GGG  
 Pro Glu Leu Met Arg Glu Asp Val Glu Phe Val Met Leu Glu Ser Glu  
 480 485 490  
 35 GAT CCA ATT TTT GAA GGC TGG ATG AGA TCT ACC GAG TGC AGT TAC AG  
 Asp Pro Ile Phe Glu Gly Trp Met Arg Ser Thr Glu Ser Ser Tyr Lys  
 495 500 505  
 40 GAT AAA TTC CGT GGA TGG GTT AGT GGA TTT AGT GGT TCC CAC AGA  
 Asp Lys Phe Arg Gly Trp Val Glu Phe Ser Val Pro Val Ser His Arg  
 510 515 520  
 45 ATA ACT GCA GGT TGC GAT ATA TTG TTA ATG CCA TCG AGA TTT GAA CCT  
 Ile Thr Ala Gly Cys Asp Ile Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro  
 525 530 535 540  
 TGC GGT CTT AAT CAG CTA TAT GCT ATG CAA TAT GGT ACA GTT CCT GTC  
 Cys Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Ala Met Gln Tyr Glu Thr Val Pro Val  
 545 550 555  
 50 GTC CAT GGA ACT GGG GGC CTC CGA GAC ACA GTC GAG ACC TTC AAC CCT  
 Val His Gly Thr Gly Lys Leu Arg Asp Thr Val Glu Thr Phe Asn Pro  
 565 570  
 55

TTT GGT GCA AAA GGA GAG GAG GGT ACA GGG TGG GCG TTC TCA CCG CTA  
 Phe Gly Ala Lys Glu Glu Gly Thr Gly Trp Ala Phe Ser Pro Leu  
 2077 575 580 585  
 5 ACC GTC GAC AAG ATG TTG TGG GCA ACC GGC ATG TCG ACA TTC  
 Thr Val Asp Lys Met Leu Trp Ala Leu Arg Thr Ala Met Ser Thr Phe  
 2125 590 595 600  
 10 AGG GAG CAC AAG CCG TCC TGG GAG GGG CTC ATG AAG CGA GGC ATG ACG  
 Arg Glu His Lys Pro Ser Trp Glu Gly Leu Met Lys Arg Gly Met Thr  
 2173 605 610 615  
 15 AAA GAC CAT ATG TGG GAC CAT GCC CCG AGC ATG AGA TCT TCG  
 Lys Asp His Thr Trp Asp His Ala Pro Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ser  
 2221 625 630 635  
 AGT GGG CCT TCG TGG ACC AAC CCT AGC TCA TGT AGA CGG GGA CTG GGG  
 Ser Gly Pro Ser Trp Thr Asn Pro Thr Ser Cys Arg Arg Gly Leu Gly  
 2269 640 645 650  
 AGG TCC AAG TGC GAG TCT CCT TCA GCT CTG AAG ACA TCC TCT TCA TCC  
 Arg Ser Lys Cys Glu Ser Pro Ser Ala Leu Lys Thr Ser Ser Ser Ser  
 2317 655 660 665  
 25 TTC CGC GGC CCG GAA GGA TAC CCC TGT ACA TTG CGT TGT CCT GCT ACA  
 Phe Arg Gly Pro Glu Gly Tyr Pro Cys Thr Leu Arg Cys Pro Ala Thr  
 2365 670 675 680  
 30 GTC GAG TCG CAA TGC TGC ATT GCT GCT GCG GCG GTG ACA GCT TCG GGT GGA CGA CAG  
 Val Glu Ser Gln Cys Ala Cys Leu Leu Trp Phe Ala Gly Ser Arg Thr  
 685 690 695 700  
 35 TAT GAC GGC TGT GCT GCT GCG GCG GTG ACA GCT TCG GGT GGA CGA CAG  
 Tyr Asp Gly Cys Ala Ala Val Thr Ala Ser Gly Gly Arg Glu  
 2461 705 710 715  
 TTA CAG TTT TGG GGA ATA AGG AAG GGA TGT GCA GGA TGG TTA ACA  
 Leu Gln Phe Trp Gly Ile Arg Lys Glu Cys Ala Ala Gly Trp Leu Thr  
 2509 720 725 730  
 40 GCA AAG CAC CAC TCA GAT GGC AGC CTC TCT GTC CGT GTC GTT ACA GCT GAA  
 Ala Lys His Ser Asp Gly Ser Leu Ser Val Arg Val Thr Ala Glu  
 2557 735 740 745  
 45 ATC AGA AAC GAA CTG GTG ACT CTT TAGCCTTAGT GATTGTGAG TTGTTGCT  
 Ile Arg Asn Gln Leu Val Thr Leu  
 2611 750 755  
 50 TCTGTGTATG TTGTCCTGTC CTTAGCTGAC AATATTGAA CCTGTTGGAG ATTATTATCT  
 TTGCTGCTGT TTTTTTTAA TCAAAAGAGG GGGTTCCCT CGATTTCATT AAAA  
 2611 2611  
 55 AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA  
 2791 2791

AAAAA AAAAAA AAAAA

2805

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

10 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 756 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ala Ala Thr Gly Val Gly Ala Gly Cys Leu Ala Pro Ser Val Arg
 1          5          10          15
Leu Arg Ala Asp Pro Ala Thr Ala Ala Arg Ala Ser Ala Cys Val val
20          25          30
Arg Ala Arg Leu Arg Leu Ala Arg Gly Arg Tyr Val Ala Glu Leu
25          30          35          40          45
Ser Arg Glu Gly Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gln Gln Gln Leu Ala
30          35          40          45
Pro Pro Leu Val Pro Gly Phe Leu Ala Pro Pro Ala Pro Ala
35          40          45          50          55          60
Gln Ser Pro Ala Pro Thr Gln Pro Pro Ala Gln Gln Gln Leu Ala
40          45          50          55          60          65
Glu Leu Ala Pro Asp Leu Leu Glu Gly Ile Ala Glu Asp Ser Ile
45          50          55          60          65          70          75          80
Asp Ser Ile Ile Val Ala Ala Ser Glu Gln Asp Ser Glu Ile Met Asp
50          55          60          65          70          75          80          85          90          95
Ala Asn Glu Gln Pro Gln Ala Lys Val Thr Arg Ser Ile Val Phe Val
55          60          65          70          75          80          85          90          95          100          105          110
Thr Gly Glu Ala Ala Pro Tyr Ala Lys Ser Gly Gly Leu Gln Asp Val
60          65          70          75          80          85          90          95          100          105          110
Cys Gln Ser Leu Pro Ile Ala Leu Ala Arg Gly His Arg Val Met
65          70          75          80          85          90          95          100          105          110          115          120          125
Val Val Met Pro Arg Tyr Leu Asn Gly Ser Ser Asp Lys Asn Tyr Ala
70          75          80          85          90          95          100          105          110          115          120          125
Lys Ala Leu Tyr Thr Ala Lys His Ile Lys Ile Pro Cys Phe Gly Gly
75          80          85          90          95          100          105          110          115          120          125          130          135

```

2805

Ser His Glu Val Thr Phe Phe His Glu Tyr Arg Asp Asn Val Asp Trp
 210 215 220
 5 Val Phe Val Asp His Pro Ser Tyr His Arg Pro Gly Ser Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Asp Asn Phe Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gln Phe Arg Tyr Thr Leu Leu
 10 245 250 255
 Cys Tyr Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ile Leu Glu Leu Gly Gly Tyr
 260 265 270
 Ile Tyr Gly Gln Asn Cys Met Phe Val Val Asn Asp Trp His Ala Ser
 15 275 280 285
 Leu Val Pro Val Leu Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro Tyr Gly Val Tyr
 290 295 300
 20 Arg Asp Ser Arg Ser Thr Leu Val Ile His Asn Leu Ala His Gln Gly
 305 310 315 320
 Val Glu Pro Ala Ser Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp
 325 330 335
 25 Tyr Gly Ala Leu Glu Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala Arg Arg His Ala
 340 345 350 355
 Leu Asp Lys Gly Glu Ala Val Asn Phe Leu Lys Gly Ala Val Val Thr
 360 365
 Ala Asp Arg Ile Val Thr Val Ser Gln Gly Tyr Ser Trp Glu Val Thr
 370 375 380 385
 30 355 360 365
 35 Thr Ala Glu Gly Gln Gly Leu Asn Gln Leu Ser Ser Arg Lys
 390 395 400
 Ser Val Leu Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn Asp Trp Asn
 40 405 410 415
 Pro Thr Thr Asp Lys Cys Leu Pro His His Tyr Ser Val Asp Asp Leu
 420 425 430
 Ser Gly Lys Ala Lys Cys Lys Ala Glu Leu Gln Lys Glu Leu Gly Leu
 45 435 440 445
 Pro Val Arg Glu Asp Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp
 450 455 460
 50 Tyr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Leu Ile Ile Pro Glu Leu Met
 465 470 475 480
 Arg Glu Asp Val Gln Phe Val Met Leu Gln Lys Ser Gly Asp Pro Ile Phe
 485 490 495

12.05.99



(B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Oligonucleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

10 TGTGGCTGCCA AGTGAGGGAGG

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Oligonucleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

20 CCACTCACAA ACACGTTAGCT ACG

25

Patentansprüche:

AGR 98/M 205

1. Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer

Stärkesynthase aus Weizen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

(a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt,  
 (b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz,  
 (c) Nucleinsäuremoleküle, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren oder komplementär sind, und  
 (d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht.

15

2. Nucleinsäuremoleküle nach Anspruch 1, das ein DNA-Molekül ist.

...

3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.

...

4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein RNA-Molekül ist.

...

5. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.

...

25 6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, das ein Oligonucleotid mit einer Länge von mindestens 15 Nucleotide ist.

...

7. Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

53

8. Vektor nach Anspruch 7, worin das Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

5 9. Wirtszelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 7 bis 8 transformiert ist oder von einer solchen Zelle abstammt.

10. Protein, codiert durch ein Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4.

11. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 10, worin eine Wirtszelle nach Anspruch 9 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des besagten Proteins erlauben und besagtes Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

12. Transgene Pflanzenzelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 7 bis 8 transformiert wurde oder die von einer solchen Zelle abstammt, und besagtes Nucleinsäuremolekül, unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die die Transkription einer translatierten mRNA in pflanzlichen Zellen erlauben.

13. Pflanze, enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 12.

14. Pflanze nach Anspruch 13, die eine Nutzpflanze ist.

15. Pflanze nach Anspruch 14, die eine stärkespeichernde Pflanze ist.

16. Pflanze nach Anspruch 15, die eine Weizenpflanze ist.

54

8. Vektor nach Anspruch 7, worin das Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

17. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 13 bis 16, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 12.

5 18. Stärke, erhältlich aus einer Zelle gemäß Anspruch 12, einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 13 bis 16 oder aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 17.

19. Transgene Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, daß in dieser Pflanzenzelle die Aktivität eines Proteins nach Anspruch 10 verringert ist.

10. Pflanzenzelle nach Anspruch 19, wobei die Verringerung der Aktivität in dieser Zelle durch die Expression einer anti-sense-RNA zu Transkription eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 erreicht wird.

20. Pflanzenzelle nach Anspruch 19, wobei die Verringerung der Aktivität in dieser Zelle durch die Expression einer anti-sense-RNA zu Transkription eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 erreicht wird.

15 21. Pflanze, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 19 oder 20.

22. Pflanze nach Anspruch 21, die eine Nutzpflanze ist.

23. Pflanze nach Anspruch 22, die eine stärkespeichernde Pflanze ist.

24. Pflanze nach Anspruch 23, die eine Weizenpflanze ist.

25. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 21 bis 24, enthaltend Zellen nach Anspruch 19 oder 20.

26. Stärke, erhältlich aus einer Zelle gemäß Anspruch 20, einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 21 bis 24 oder aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 25.

30

- 27. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, vorzugsweise von Back- oder Teigwaren.
- 28. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

56

AGR 98/M 205

## Zusammenfassung

Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind

4

Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um lösliche Stärkesynthetasen aus Weizen.

10

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren und Wirtszellen, die die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle enthalten, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der erfundungsgemäßen löslichen Stärkesyntethasen aufweisen

1

M 12.05.99

55

THIS PAGE BLANK (USPTO)